

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：17104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460145

研究課題名(和文) テーラーメイド構造ライブラリからの新規トリクロサン類縁抗結核化合物の有機合成展開

研究課題名(英文) Design and synthesis of anti-tuberculosis triclosan analogs with in silico tailored chemical structure library

研究代表者

青木 俊介 (aoki, shunsuke)

九州工業大学・大学院情報工学研究院・教授

研究者番号：30392426

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：結核菌タンパク質を標的とした新規抗菌薬探索の研究を進め階層的結合シミュレーションによる新規スクリーニング法を確立し、新規抗菌化合物を同定してきた。中でも結核菌InhAに作用し抗菌活性を有する新規化合物KES4を発見した。本研究ではKES4類縁体に特化したテーラーメイド化合物ライブラリを構築しInhAを標的としスクリーニングを行ない新規類縁体の同定と合成に成功した。新しく合成した5種類の類縁体の50%阻害濃度はKES4が9.6 μ Mに対し1.8 μ M, 2.2 μ M, 3.4 μ M, 7.8 μ M, 5.0 μ Mであり目的を達成した。3化合物は腸内モデル細菌や各種ヒト培養細胞に対して有意な毒性を示さなかった。

研究成果の概要(英文)：In the past our research of in silico antibiotics screenings, we succeeded to identify several new chemical compounds with anti-tuberculosis activity. One of the compounds, KES4, was thought to be a promising lead compound with the highest mycobacterial selectivity. In this study we constructed in silico KES4-tailored chemical structure library, screened KES4-analog structures with higher activity and synthesized the analogs. We tested the activities of these analogs by bacteria growth inhibitory assay, and we identified 5 analogs with higher mycobacterial growth inhibitory activities, IC50 values = 1.8 μ M, 2.2 μ M, 3.4 μ M, 7.8 μ M, 5.0 μ M vs KES4 activity = 9.6 μ M. Among them, 3 analogs do not have any toxicity against both human cultured cells and E. coli.

研究分野：ケモインフォマティクス

キーワード：結核 ドッキングシミュレーション 創薬化学 有機合成 テーラーメイド創薬

1. 研究開始当初の背景

結核はマイコバクテリア属の結核菌により引き起こされる感染症であり、世界中に蔓延し毎年 100 万人以上が死亡する。また、国内でも多剤耐性結核患者が発生する事例が見られる。しかしながら、主に貧困な国々の疾患であるため製薬会社の投資は鈍く、40 年以上新薬は登場していなかったが、極最近 1 例の薬剤開発が報告された (Koul, Nature, 2011)。主要な抗結核薬の 1 つである isoniazid は結核菌細胞壁のミコール酸合成に関わる FAS-II 経路に必須のエノイル・リダクターゼ InhA を標的とする。isoniazid は prodrug であり結核菌内の KatG によって活性化され初めて InhA を阻害し抗菌効果を発揮する。臨床で見つかる isoniazid 耐性菌にはこの KatG に変異を有するものがみられ、KatG を介さず InhA に直接結合し阻害する新規薬剤の開発が期待されている。一方、化粧品や石鹸等に含まれる汎用殺菌剤の triclosan は多くの細菌種のエノイル・リダクターゼ活性を直接阻害するが、結核菌 InhA に対しても直接阻害効果を有するため、薬剤耐性結核菌にも高い抗菌効果を発揮する。しかしながら、結核治療薬の長期投与の必要性から患者腸内細菌を殺菌し重篤な副作用をもたらす triclosan は応用できない。そこで、結核菌選択性を付与し抗結核薬として triclosan を応用するために化学的に改変した誘導体が 10 年ほど前から 100 種類以上合成されてきた (Sacchetti ら, 2005, 2006, 2009)。その中には InhA に対する阻害効果が上昇するものも同定されたが、結核菌に対して選択的作用をもつ誘導体は創出できなかった。他方、研究代表者らは結核菌タンパク質を標的とした新規抗菌薬探索の研究を進め、大規模な化合物立体構造ライブラリを構築し独自の階層的結合シミュレーションによる *in silico* スクリーニング法を確立するとともに (Hirayama et al Bioorg Med Chem, 2007; Mitsui et al, Neurochem Int, 2008, Koseki and Aoki, Curr Top Med Chem, [総説] 2013) マイコバクテリア属細菌に選択的な抗菌作用を有する新規化合物を数多く同定してきた (Izumizono et al. Eur. J. Med. Chem. 2011; Koseki et al., Eur J Med Chem, 2013)。さらに InhA に直接作用し結核菌選択的に抗菌作用を発揮する新規 triclosan 類縁化合物 KES4 を発見することに成功していた (Kinjo ら, J Chem Info Model (ACS) 2013)。

2. 研究の目的

本研究では多様な類縁体からの目的化合物の同定を目指し *in silico* の薬剤デザイン手法と有機合成手法を組み合わせ、KES4 合成展開に特化したテーラーメイド化合物構造ライブラリを作成することを目指した。さらに種々の精密な結合シミュレーション

を駆使し、結核菌選択性が保持された高活性の KES4 誘導体構造群を計算機上で探索する。高い有効性が予測された化合物を実際に有機合成し、結核菌 InhA に対するより強い酵素活性阻害効果、結核菌への選択性、ヒト細胞への安全性を証明し、最終的には新規の KES4 誘導体を見つけ出すことを最終的な目的とした。

3. 研究の方法

KES4 の 4 つの環状構造を多段階で順次連結させてゆく合成経路を確立し、各環構造の修飾体を導入することで KES4 類縁化合物を市販原料から合成した。KES4 の合成展開に特化したテーラーメイド化合物構造ライブラリを 2 次元化合物構造からの 3 次元化手法と LowMode MD のエネルギー最小化手法によって *in silico* で作成した。結核菌 InhA とのドッキングシミュレーションでは剛体ドッキング手法ならびに遺伝的アルゴリズムによるフレキシブルドッキング等の手法を駆使してより結合性の高い化合物を予測した。それら化合物を至適溶媒ならびに至適温度・反応時間条件において有機合成し KES4 よりも効果の高い可能性のある化合物を合成し、結核菌に対する抗菌効果をモデル結核菌の培養系に添加することで調べた。さらに神経系、肝臓、血球、腎等の各種ヒト細胞種に対する毒性を調べた。

KES4 と InhA の結合モデル構造では 4 環構造 (A-D リング) の末端のフロイル基 (D リング) が InhA の Leu218, Tyr158 と、また隣接するピペラジン基 (C リング) とその近傍部分は Met199, Phe149 と相互作用していることが予想されていた。KES4 は InhA の活性中心近傍の 2 つの出口をもつ筒状ポケットの中心部分に直鎖状に埋め込まれており両端には化学修飾可能な空間が広がっている。そこで主として両末端の環構造を修飾した類縁体に関する構造ライブラリを構築しシミュレーション後に有機合成し、InhA と新たな相互作用を形成する化合物を *in silico* でデザインした。具体的には KES4 の類縁体合成に利用可能な置換ピペラジン化合物 (CD リング) を類縁体構築の標的部位とし、ジフェニルエーテル部分 (AB リング) の連結環状構造は異なる 2 種類のベンゼン環を連結させて合成し、その後置換ピペラジン化合物を連結して合成した。合成した KES4 類縁体を NMR・TOF-Mass 等で分析し合成を確認して精製した。新規に有機合成した化合物は各種細菌に対する抗菌効果ならびに抗菌スペクトル・毒性を検証した。

4. 研究成果

本研究では InhA を標的とした *in silico* スクリーニングから薬剤耐性を回避可能な A リングから D リングの 4 リング構造を有する新

規化合物 KES4 類縁体の同定に成功した。KES4 の合成展開に特化したテララーメード化合物構造ライブラリを構築し、より高い活性を有する誘導体化合物を結合シミュレーション手法で予想し、当初の目的通り有機合成し高選択性の次世代抗結核薬の候補化合物を創出できた。

KES4 に特化したテララーメード化合物構造ライブラリから標的タンパク質との結合シミュレーションにより候補化合物を 10 種類予測し、それら化合物の有機合成を行った。さらに、これらの化合物の抗菌効果の検証と培養細胞での毒性の検証を行った。その結果 KES4 よりも抗菌効果の高い新規抗菌化合物を 5 種類合成することに成功した。それぞれの結核モデル細菌 (*M. smegmatis*) の増殖に対する 50% 阻害濃度 (IC50) は KES4 が 9.6 μ M に対し 1.8 μ M, 2.2 μ M, 3.4 μ M, 7.8 μ M, 5.0 μ M であり目的を達成した。一方、5 化合物中 3 化合物は腸内モデル細菌や各種ヒト培養細胞に対して有意な毒性を示さなかった。研究期間全体を通じての成果をまとめると、(1)KES4 に特化したテララーメード化合物構造ライブラリの構築、(2)KES4 を A リングから B と C, D リングへ連結する新規合成経路を確立、最終的に(3) KES4 より活性の高い 5 種類の新規類縁化合物 (うち 3 種類は毒性無し) の合成に成功したことがあげられる。本研究によってテララーメード化合物構造ライブラリを利用した新規の創薬基盤が確立され、さらに本手法を用いれば結核菌に特異的な抗菌効果を有し毒性を有さない化合物を合成することが可能であることを示すことが出来た。in silico の計算科学と有機合成を組み合わせる手法は、今後、自由な化合物の設計、探索を可能にすると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 18 件)

Yuji Koseki, Hironori Kanetaka, Joji Tsunosaki, Herene Munier-Lehmann, Shunsuke Aoki. Tetrahydro-2-furanyl-2,4-(1H, 3H)-pyrimidinedione derivatives as novel antibacterial compounds against Mycobacterium. *Int. J. Mycobacterology* 6 p61-69, 2017. (査読有り).

Junichi Taira, Takashi Ito, Hitomi Nakatani, Tomohiro Umei, Hiroki Baba, Shotaro Kawashima, Taira Maruoka, Hideyuki Komatsu, Hiroshi Sakamoto, Shunsuke Aoki, In silico Structure-based Drug Screening of Novel Antimycobacterial Pharmacophores by DOCK-GOLD Tandem Screening. *Int. J. Mycobacterology* 2017, in press. (査読有り).

Tsunosaki J, Mieno Y, Hamade Y, Aoki S,

Prediction of antimicrobial action mechanism on chemical compounds of essential oils using chemoinformatics methods. *Japan Journal of Aromatherapy* 16, 25-36. 2016. (査読有り).

Othman DIA, Kitamura M, Diazonaphthoquinones: Synthesis, Reactions and Applications. *Heterocycles*, DOI: 10.3987/REV-16-845. 2016. (査読有り).

Kitamura M, Ishikawa A, Okauchi T, Synthesis, structure, and reaction of chiral 2-azidoimidazolium salts: (7aS)-3-azido-5,6,7,7a-tetrahydro-2-[(1R)-1-phenylethyl]-1H-pyrrolo[1,2-c]imidazolium hexafluorophosphate and 2-azido-1,3-bis[(S)-1-phenylethyl]imidazolium hexafluorophosphate. *Tetrahedron Lett.* 57, 1794-1797. 2016. (査読有り).

Kitamura M, Fukuma, H.; Kobayashi, M.; Okayama, S.; Okauchi, T. Axially Chiral Bifunctional 8,8-Biquinolyl: Synthesis of 7,7-Dihydroxymethyl-8,8-biquinolyl via Pd-Catalyzed Double C-H Oxidation of 7,7-Dimethyl-8,8-biquinolyl. *J. Org. Chem.* 81, 3956-3960. 2016. (査読有り).

Sakai K, Aoki S, Matsumoto K. Hepatocyte growth factor and Met in drug discovery. *J Biochem.* 157, p271-284. 2015. (査読有り).

Kanetaka H, Koseki Y, Taira J, Umei T, Komatsu H, Sakamoto H, Gulten G, Sacchettini JC, Kitamura M, Aoki S. Discovery of InhA inhibitors with anti-mycobacterial activity through a matched molecular pair approach. *Eur J Med Chem.* 94, p378-385. 2015 (査読有り).

Kitamura M, Takahashi S, Okauchi T. Rh-catalyzed Cyclization of 3-Aryloxycarbonyldiazonaphthoquinones for the Synthesis of -Phenyl-naphthalene Lactones and Formal Synthesis of Pradimicinone. *J. Org. Chem.* 80, 8406-8416. 2015. (査読有り).

Kitamura M, Murakami K, Synthesis of 2-Azido-1,3-dimethylimidazolium Hexafluorophosphate. *Org. Synth.* 92, 171-181. 2015. (査読有り).

Okauchi T, Sata N, Urakawa A, Kitamura M. Unprecedented formation of hapto-4-(vinylketene)iron complexes from hapto-4-(diene)iron complexes and aromatic compounds in the presence of Lewis acid. *Chem. Commun.* 51, 8454-8456.

2015. (査読有り).

Kitamura M, Yuasa R, Van Vranken DL Synthesis of the Cyclic Prenylguanidine Nitensidine E using a Palladium-Catalyzed Carbenylative Amination *Tetrahedron Lett.* 56, 3027-3031. 2015. (査読有り).

Kitamura M, Sakata R, Tashiro N, Ikegami A, Okauchi T Synthesis of Diazonaphthoquinones from Naphthols by Diazo-transfer Reaction T. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 88, 824-833. 2015. (査読有り).
Kobayashi M, Kinjo T, Koseki Y, Bourne CR, Barrow WW, Aoki S. Identification of novel potential antibiotics against *Staphylococcus* using structure-based drug screening targeting dihydrofolate reductase. *J Chem Inf Model.* (ACS).54(4):1242-53. 2014. (査読有り).

Koseki Y, Aoki S. Computational medicinal chemistry for rational drug design: Identification of novel chemical structures with potential anti-tuberculosis activity. *Curr Top Med Chem.*;14(1):176-88. 2014 Review. (査読有り).

Kitamura M, Kato S, Yano M, Tashiro N, Shiratake Y, Sando M, Okauchi T Reagent for safe and efficient diazo-transfer to primary amines: 2-azido-1,3-dimethylimidazolium hexafluorophosphate. *Org. Biomol. Chem.* 12, 4397-4406. 2014. (査読有り).

Kitamura M, Kisanuki M, Kanemura K, Okauchi T Pd(OAc)₂-Catalyzed Macrocyclization of 1,2-Diazonaphthoquinones with Cyclic Ethers. *Org. Lett.* 16, 1554-1557. 2014. (査読有り).

Kitamura M, Kubo K, Yoshinaga S, Matsuzaki H, Ezaki K, Matsuura T, Matsuura D, Fukuzumi N, Araki K, Narasaki M Synthetic study of kosinostatin aglycone: Synthesis of BCDE rings using alkoxycarbonylmethylation of diazonaphthoquinone, *Tetrahedron Lett.* 55, 1653-1656. 2014. (査読有り).

[学会発表](計 6件)

安恒 英、青木俊介、松本邦夫、酒井克也、馬場弘樹、角崎丈司. 増殖因子-受容体相互作用をターゲットとした抗癌剤候補化合物の探索. 金沢大学がん進展制御研究所共同利用・共同研究拠点シンポ 2017年02月14日金沢大学(石川県金沢市).

青木俊介 低コストな化合物バーチャルスクリーニング技術とその応用事例, 第29回日本動物実験代替法学会シンポジウム(招待講演)福岡市, 2016年11月16日.
川島翔太郎、角崎丈司、平島まりも、青木

俊介 精油化学成分に着目した系統樹作成とその評価日本生物工学会九州支部会 2016年12月3日九州工業大学(福岡県飯塚市).

角崎丈司、川島翔太郎、平島まりも、青木俊介 ドッキングシミュレーション手法を用いた精油構成化学成分の抗菌作用機序の予測 日本生物工学会九州支部会 2016年12月03日九州工業大学(福岡県飯塚市).

Yuji Koseki, Hironori Kanetaka, Munier-Lehmann, Shunsuke Aoki. Identification of novel potential antibiotics against *Mycobacterium* using pharmacophore-based in silico screening targeting thymidine monophosphate kinase, CBI学会2014年大会, 2014年10月28日タワーホール船堀(東京都江戸川区).

Hironori Kanetaka, Yuji Koseki, Shunsuke Aoki. Discovery of InhA inhibitors with anti-mycobacterial activity through matched molecular pair approach CBI学会 2014年大会2014年10月28日タワーホール船堀(東京都江戸川区).

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

[その他]

ホームページ等

<http://aoki lab.boy.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青木 俊介 (AOKI, Shunsuke)

九州工業大・大学院情報工学研究院・教授
研究者番号: 30392426

(2) 研究分担者

北村 充 (KITAMURA, Mitsuru)

九州工業大・大学院工学研究院・教授
研究者番号: 10313199

(3) 連携研究者

松本 邦夫 (MATSUMOTO, Kunio)

金沢大学・がん進展制御研究所・教授
研究者番号: 90201780

(4) 研究協力者

なし